

Grundpraktikum Genetik - Bakteriophagen als genetisches Modellsystem

<http://quintlab.openwetware.org>

Bakteriophagen:

→ teaching

Viren, die Bakterien als Wirt nutzen → ‚Bakterienesser‘

Virus (*lat.*):

Gift, Saft, Schleim

Gelten nicht als Lebewesen

→ enthalten lediglich Erbinformationen zur eigenen Vermehrung

→ kein eigener Stoffwechsel

ca. 50 Mio = 5×10^7 Viren pro ml Meerwasser → noch mehr in Erde

→ **10^{31}** Viren auf der Erde

→ Phagen lysieren bis zu 40% aller Bakterien in den Weltmeeren → **CO₂ Bilanz**

Entdeckung Viren



The generally recognised beginning of Virology is a paper presented to the St. Petersburg Academy of Science on the 12th February **1892** by **Dimitri Iwanowski** (1864-1920), a Russian botanist. He showed that extracts from diseased tobacco plants could transmit disease to other plants after passage through ceramic filters fine enough to retain the smallest known bacteria.

Entdeckung Bakteriophagen



“Bakterielle Viren” wurden zuerst von Frederick Twort (in 1915; links) und Felix d’Hérelle (in 1917; rechts) beschrieben. d’Hérelle bezeichnete sie wegen ihrer Eigenschaft Bakterien auf der Oberfläche von Agarplatten zu lysieren als “Bacteriophagum intestinale”. Diese Viren wurden rasch von vielen Wissenschaftlern als Modellorganismen für verschiedene Aspekte der Virologie (Struktur, Genetik, Replikation) genutzt.

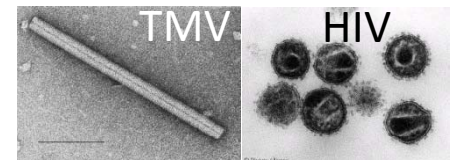
Phagen/Viren allgemein

Charakteristika

1. Obligate intrazelluläre Parasiten → **brauchen Wirtszelle**
 2. Klein: filtrierbar durch bakteriologische Filter
 3. Enthalten einen Typ von Nukleinsäure (DNA oder RNA)
 4. Tragen eine Proteinhülle (Capsid)
- } → **Aufbau**
6. Vermehren sich innerhalb lebender Zellen unter Nutzung der biosynth. Maschinerie des Wirtes → **Polymerasen, Ribosomen, etc.**
→ **Umprogrammierung des Wirtes für eigene Zwecke**

Morphologische Typen

- Helikal, z.B. Bakteriophage M13, Tabakmosaikvirus (TMV)
- Polyeder, z.B. Picornavirus, Poliovirus
- Umhüllt, entweder mit helikalem (z.B. Herpes simplex) oder polyedrischem (z.B. Influenza) Capsid
- Komplex, z.B. Bakteriophage λ , Pockenvirus



Phagen/Viren allgemein

T-Phagen

Name	Plaue- größe	Kopf (nm)	Schwanz (nm)	Latenz- zeit (min)	„Burst“- Größe
T1	mittel	50	150 x 15	13	180
T2	klein	65 x 80	120 x 20	21	120
T3	groß	45	unsichtbar	13	300
T4	klein	65 x 80	120 x 20	23,5	300
T5	klein	100	winzig	40	300
T6	klein	65 x 80	120 x 20	25,5	200-300
T7	groß	45	unsichtbar	13	300

↓
**Größe der lysierten
Plaques im
Bakterienrasen**

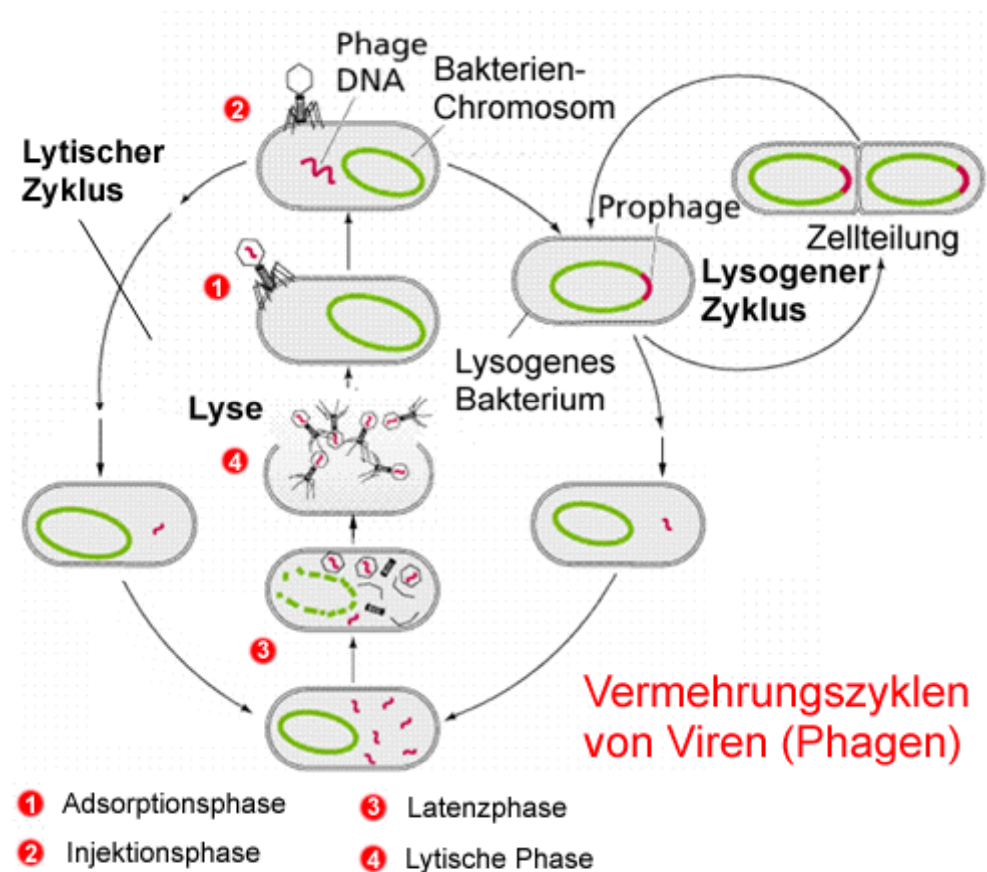
↓
**Infektion der Zelle
bis Lyse**

↓
**Anzahl freigesetzter
Phagen/Zelle**

Phagen/Viren allgemein

Vermehrungszyklus

1. Anheftung
2. Penetration
3. Nukleinsäure- und Protein-Biosynthese
4. Assembly
5. Freisetzung



Phagen – Genomgröße und Nukleinsäuren

Phage	Größe (Nt.)	Nukleinsäure	einzelsträngig	doppelsträngig	linear	zirkulär
MS2	3 569	RNA	+		+	
Q-beta	4 220	RNA	+		+	
φ6		RNA		+		
φx174	5 386	DNA	+			+
M13 (f1)	6 407	DNA	+			+
λ	48 502	DNA		+	+	
Mu	36 717	DNA		+	+	
P1	94 800	DNA		+	+	
P2	33 593	DNA		+	+	
P4	11 624	DNA		+	+	
T1	48 836	DNA		+	+	
T4	168 903	DNA		+	+	
T5	121 750	DNA		+	+	
T7	39 937	DNA		+	+	
G	~670 000	DNA		+	+	
P22	41 724	DNA		+		+

Phagen Morphologie

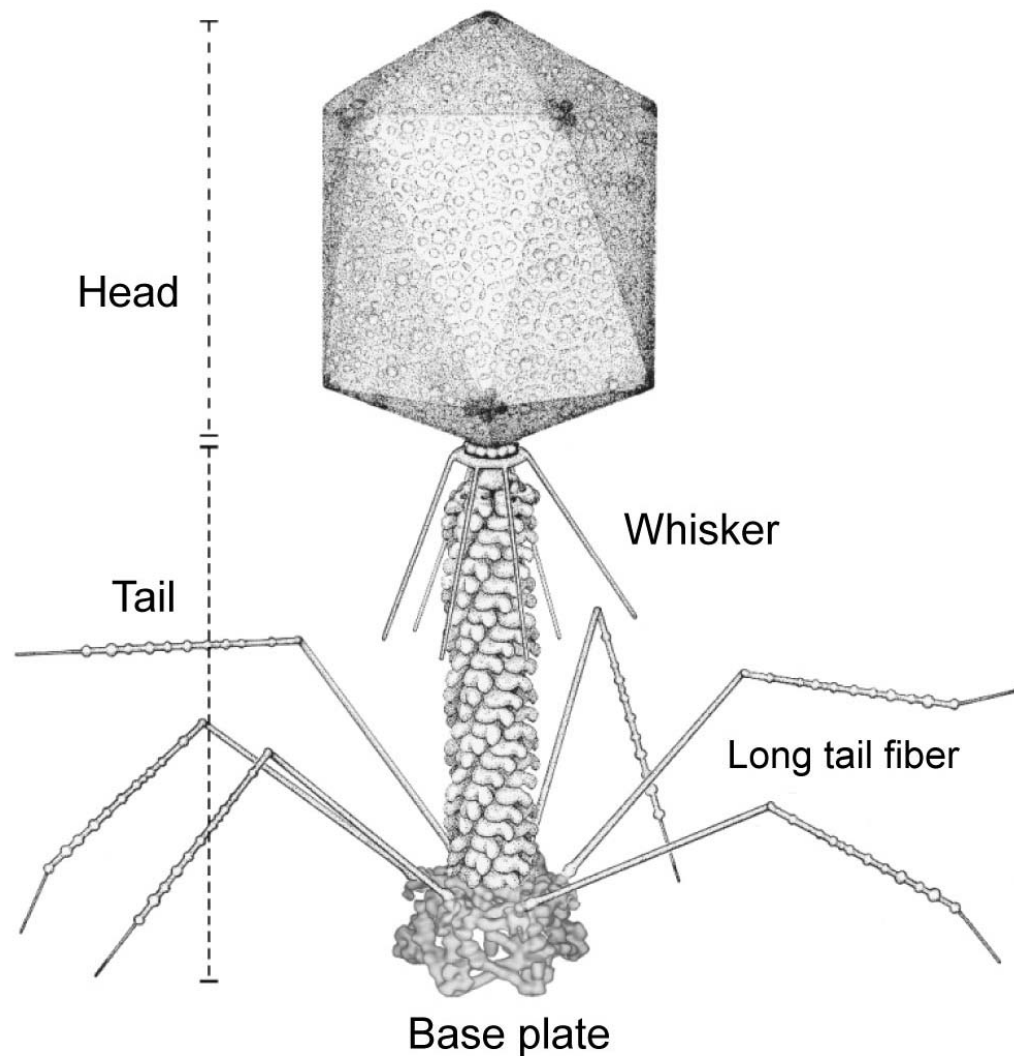
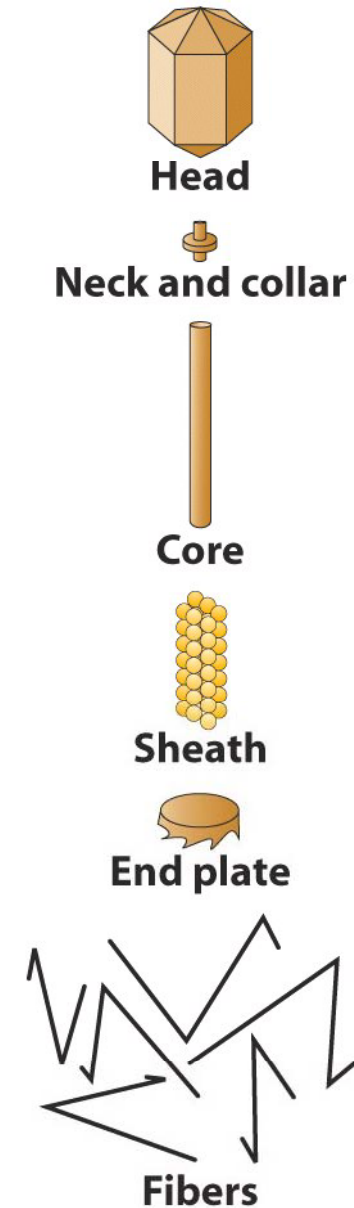


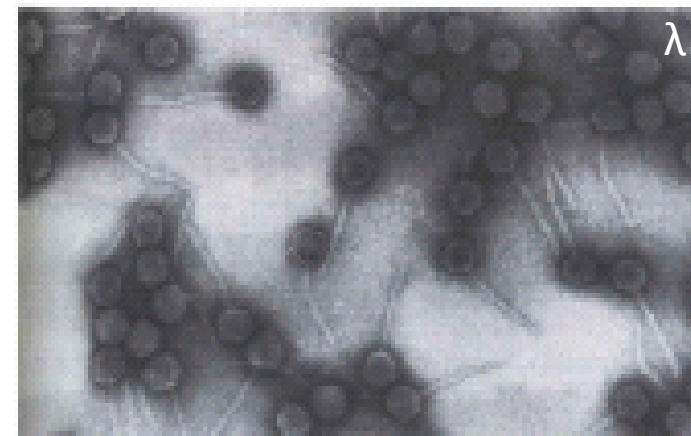
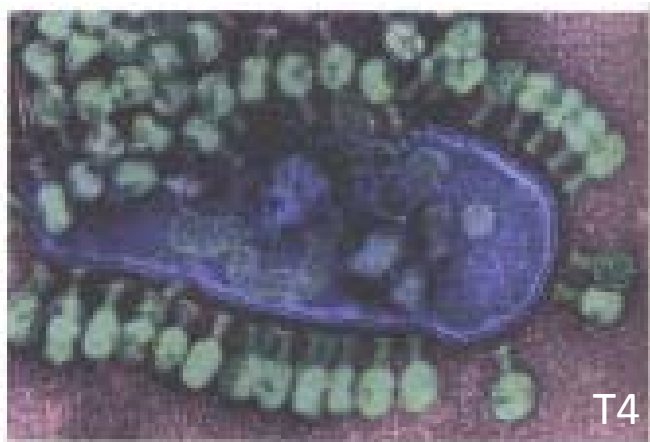
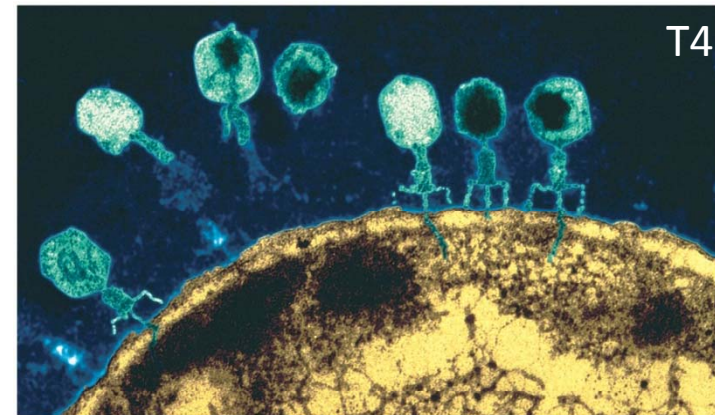
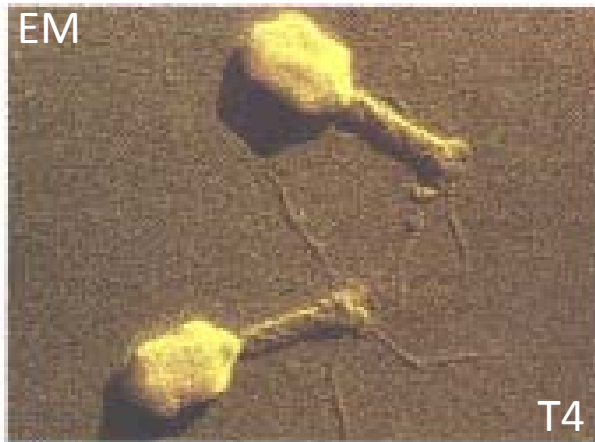
Fig.1-1

Structure of T4 phage
(Eiserling, 1983)

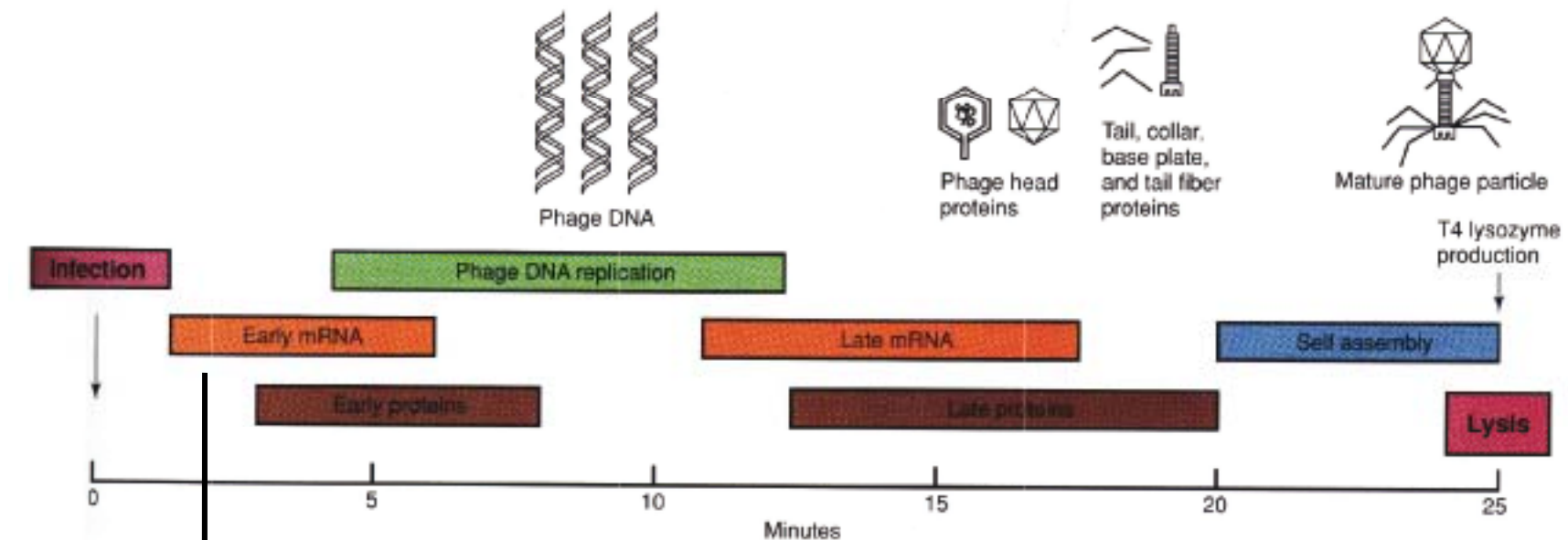
T4 phage components



Phagen Morphologie



Infektionszyklus T4

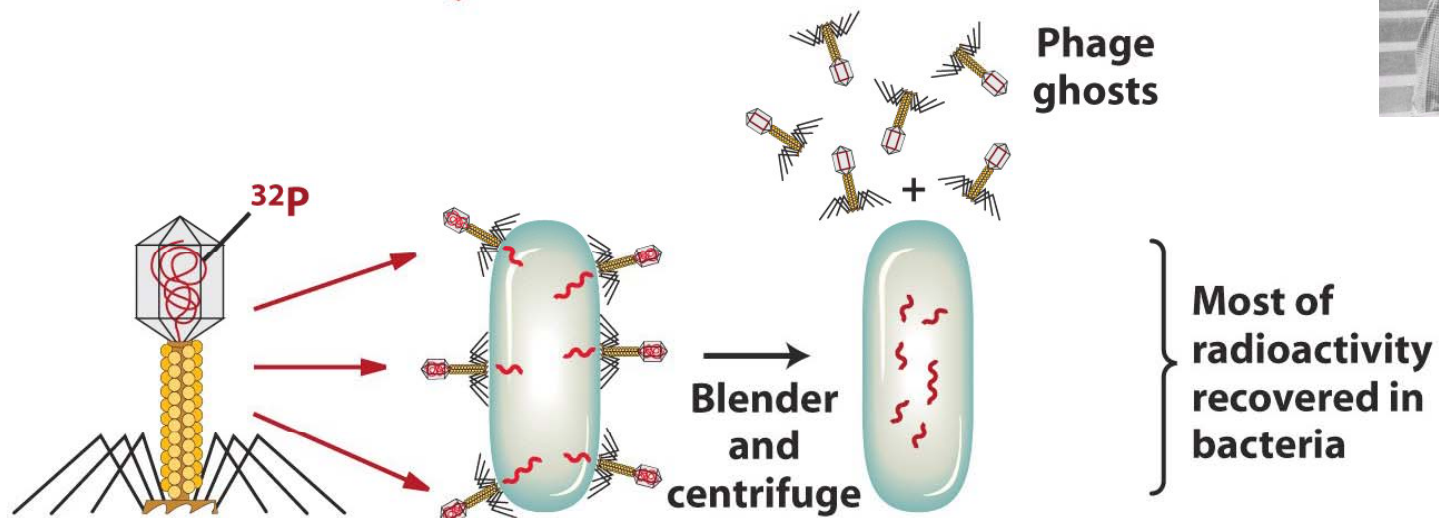
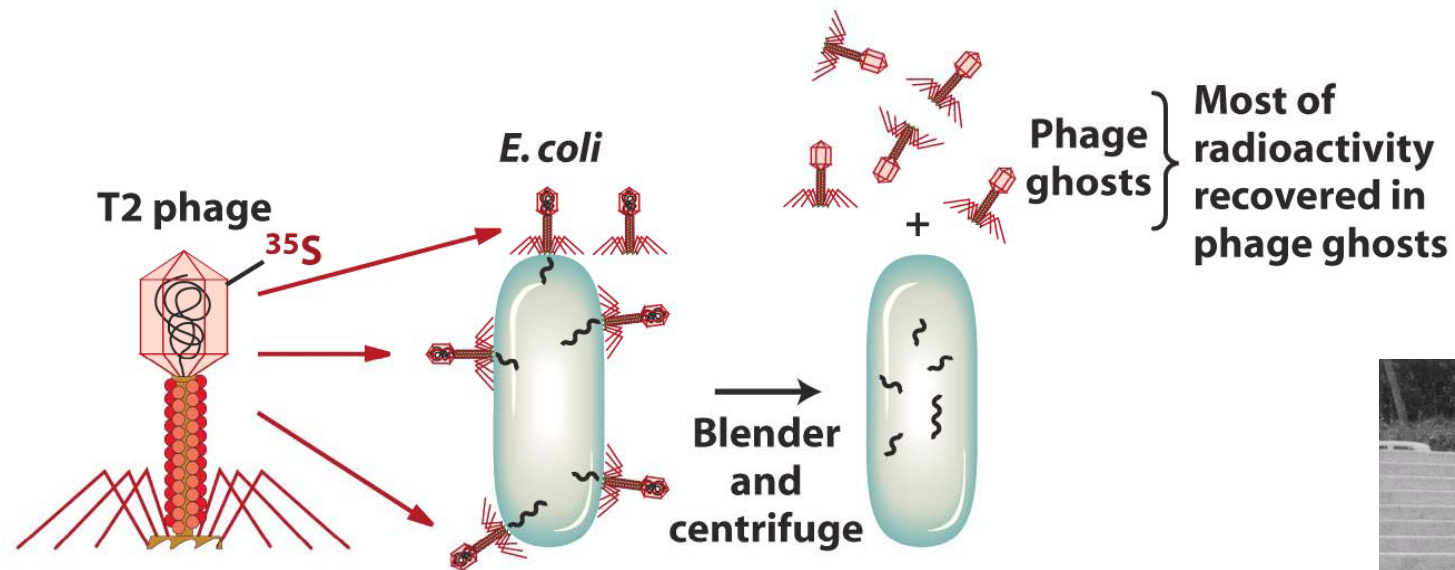


durch Wirts-Polymerase
→ DNA Polymerasen
→ Nucleasen
→ Sigma-Faktoren

Schlüsselexperimente

- 1943 Salvador E. Luria & Max Delbrück (**Fluktuationstest**). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511
- 1952 Alfred D. Hershey & Martha Chase (**DNA als Träger der Erbinformation**). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56
- 1968 S. Linn & W. Arber (**Restriktionsenzyme**). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1300-1306.
- 1973 S.N. Cohen, A.C. Chang, H.W. Boyer & R.B. Helling (**Molekulare Klonierung**). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244.
- 1977 A.M. Maxam & W. Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- 1977 F. Sanger, S. Nicklen & A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- 1977 F. Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe & M. Smith. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695.
- 1983 D.L. Daniels, J.L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, G.B. Petersen & F.R. Blattner. Appendix II: Complete annotated lambda sequence. In: R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl and R.A. Weisberg (Eds.); *LAMBDA II*: 519-674; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 1990 K. Valegard, L. Liljas, K. Fridborg & T. Unge. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345: 36-41.
- 1992 R. McKenna, D. Xia, P. Willingmann, L.L. Ilag & M.G. Rossmann. Structure determination of the bacteriophage phiX174. *Acta Crystallogr B* 48: 499-511.

Hershey & Chase (1952)

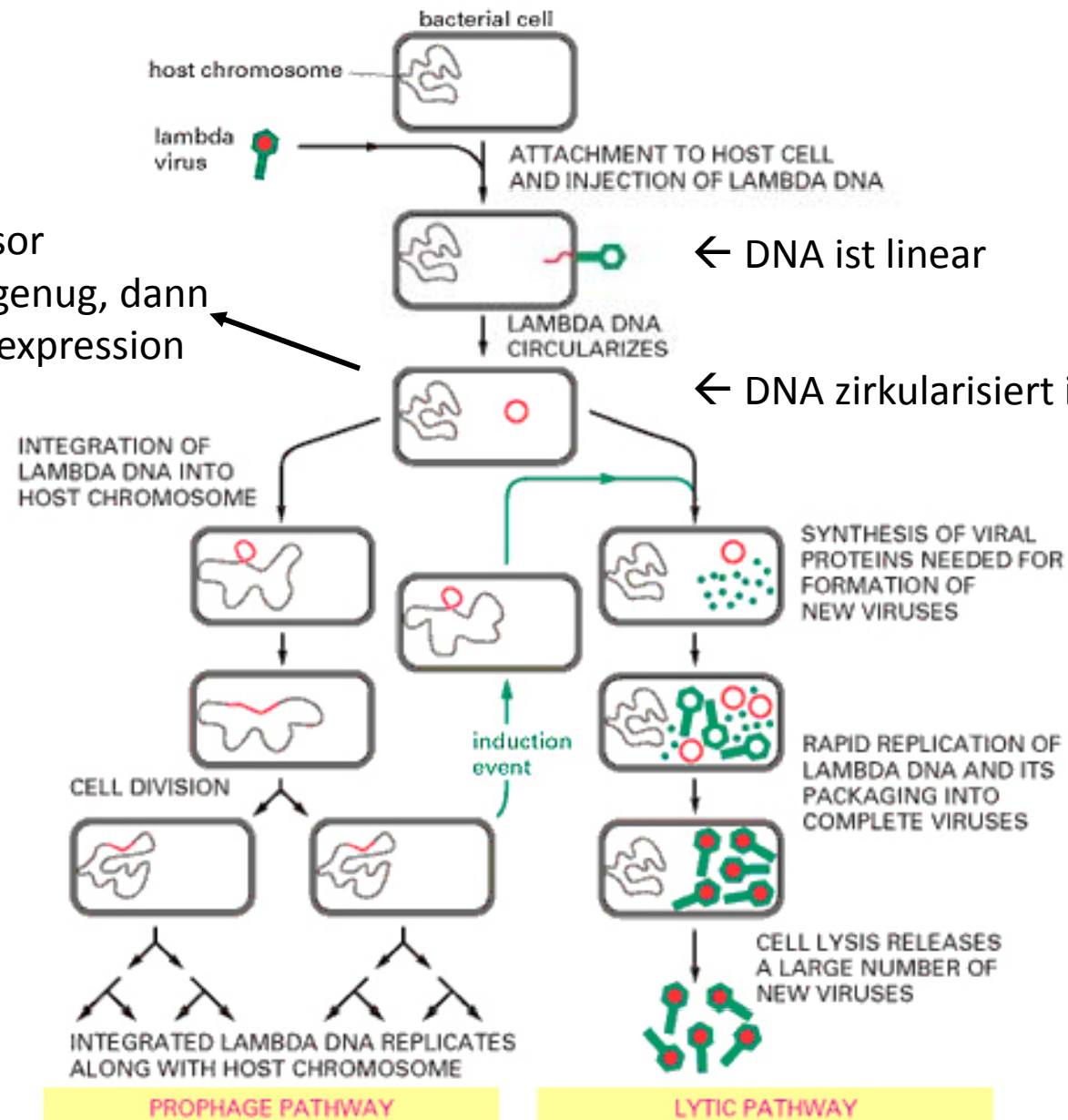


λ Phage/Prophage – lytisch/lysogen

Bildung λ Repressor

→ wenn schnell genug, dann
keine Phagengenexpression

→ Prophage



← DNA ist linear

← DNA zirkularisiert in der Zelle

← Repr. wird
abgebaut

- proteolytisch
- temp-sense in V1

Versuch I: Induktion von Prophagen

Virulente Phagen – sofort lytische Phase

Temperente Phagen – entweder lytisch oder lysogen → abh. von Repressoren



λ → λ Repressorgen *cl* → Repressorprotein verhindert Transkription von Phagengenen, die für die lytische Funktion kodieren



Zerstörung/Abbau/Fehlfunktion des λ Repressors hebt die Blockade der lytischen Gene auf



Excision der Phagen-DNA aus dem Wirtsgenom
→ Phagenproduktion → Lyse

λcl^{ts} : Repressor ist temperatursensitiv → bis 30°C Repressorfkt. normal
→ 37-42°C Inakt. des Repressors

Versuch I: Induktion von Prophagen

1. 20 ml Kultur von *E. coli* (λ cl^{ts}) → Prophage schon drin!
2. Optische Dichte messen
3. 15 min Hitzeschock im 42°C Wasserbad → Inaktivierung des Repressors
4. Inkubation bei 37°C (Schüttler)
5. Alle 20 min OD messen und auf halblogarithmischem Papier dokumentieren
6. Parallel Saalkontrolle ohne Hitzeschock mit anschließender Inkubation bei RT

Frage fürs Protokoll:

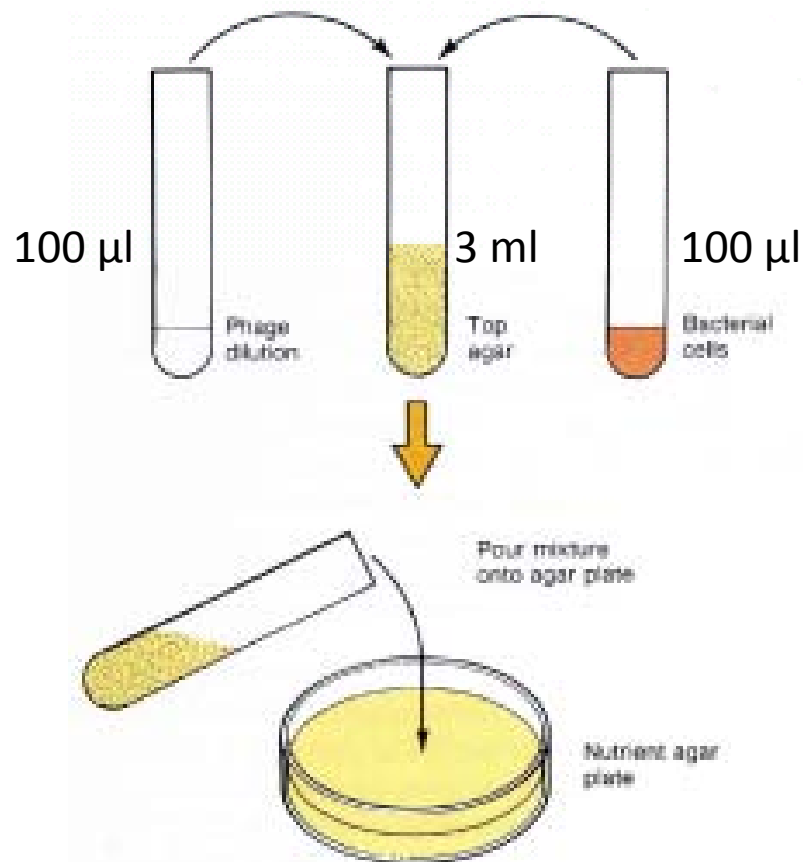
1. Warum sinkt die OD nicht auf Null?
2. Was wird passieren, wenn man die lysierten Kulturen bis morgen bei 37°C inkubieren würde? Begründen Sie Ihre Meinung.

Versuch II: Phagentiterbestimmung

Wie hoch ist der Titer der Phagen in der lysierten *E. coli* Kultur?

→ Anzahl Phagen/ml

1. Verdünnungsreihe des Phagenlysats mit SM-Puffer bis 10^{-8}
2. Plattieren der letzten drei Verdünnungen (10^{-6} - 10^{-8}) wie folgt:



3. Auszählen der Phagenplaques der letzten Praktikumsgruppe
4. Bestimmung des Titers

Versuch II: Methode 2

Bestimmung der *Burst Rate* aus der eigenen lysierten *E.coli* (λ cl^{ts}) Kultur:

1. *Quick and dirty* Phagentiterbestimmung

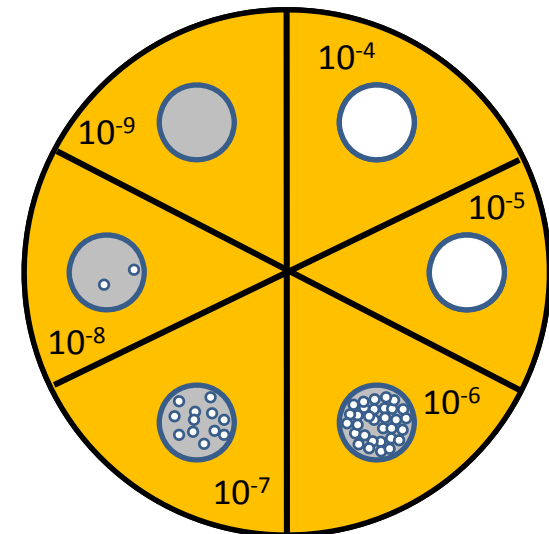
- eigenes Phagenlysat mit SM-Puffer bis 10^{-9} verdünnen
- LB-Platte ,sechsteilen‘
- 100 μ l *E.coli* (aus Methode 1) mit Topagar mischen und auf LB-Platte \rightarrow trocknen
- Je 10 μ l der 10^{-4} – 10^{-9} Verdünnung auftropfen
- Platte von Vorgruppe auswerten \rightarrow xy pfu/ml

2. Anzahl der eigenen *E.coli* (λ cl^{ts}) Zellen bei Lyse

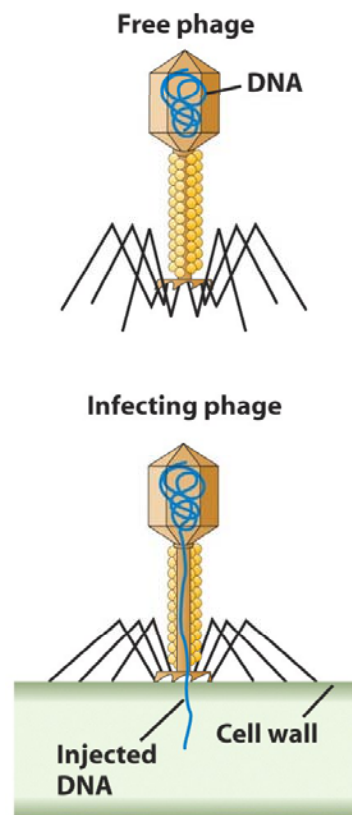
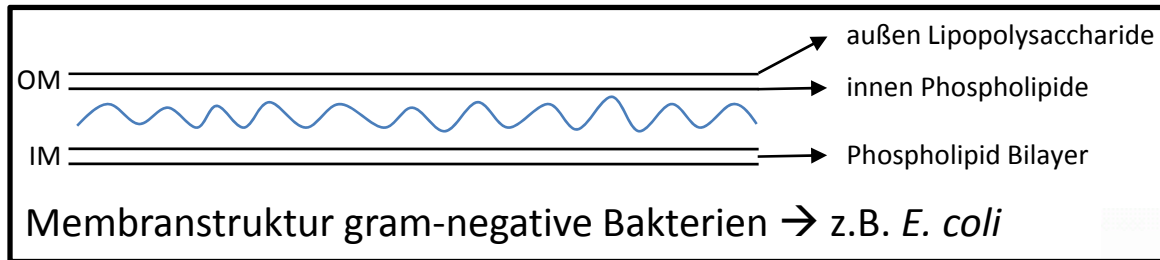
- $(OD_{\max} - OD_{\min}) \times 10^9$ cfu/ml

3. *Burst Rate*

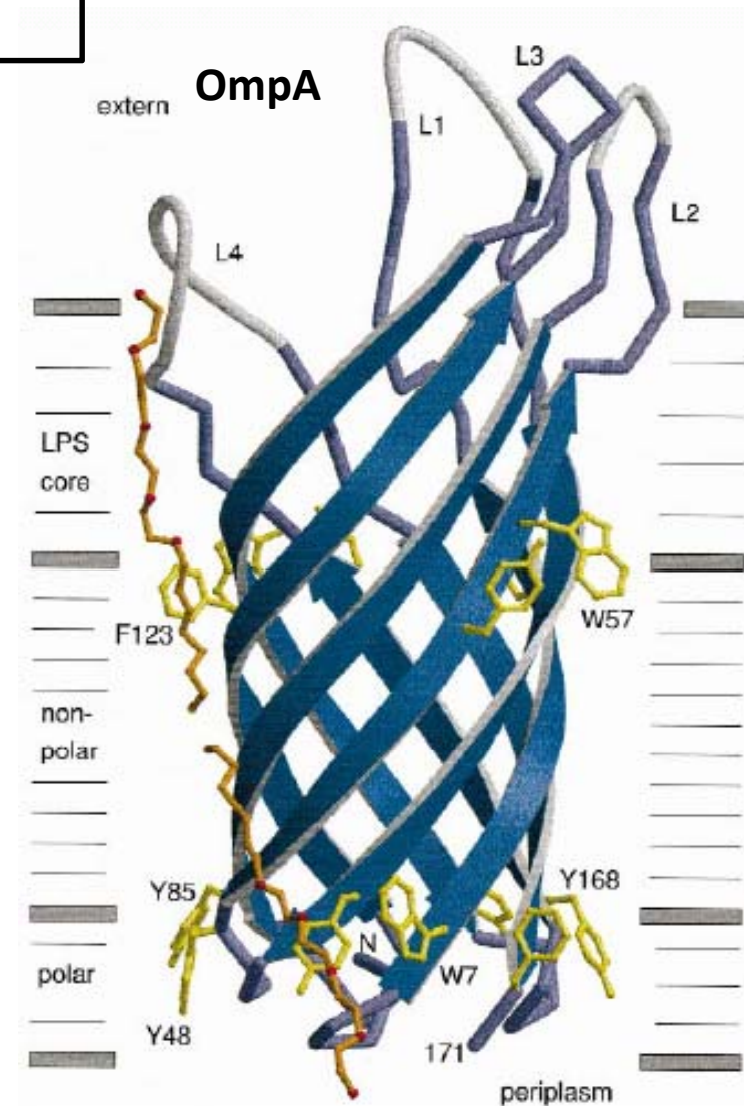
- pfu / cfu



OMPs - Außenmembranproteine



Gibt es spezifische Binde-/Erkennungsstellen an der äußeren Membran der Bakterien für Phagen?



Funktion OMPs

Protein	Größe	Funktion	Phagen
Lpp	58	strukturelle Funktion	
OmpA	325	strukturelle Funktion	TuII*, K3, M1, Ox2
OmpX	148	Pathogenität	
PldA	269	Phospholipase	
OmpT	297	Protease	M1h1.1h1
OmpP	292	Protease	Ox2h12h1.1
OmpC	346	Diffusionspore	TuIb, T4, SS1, TP2, PA2, M1h1.1
OmpF	340	Diffusionspore	TuIa, TP1, TP2, SQ108
OmpN	356	Diffusionspore	
PhoE	330	Anionen-spezifische Diffusionspore	TC23, TC45
LamB	421	Maltodextrin-spezifische Pore	λ , K10, TP1, SS1
FadL	421	Fettsäuretransport	T2
Tsx	262	Nukleosid-spezifische Pore	T6, Ox1, K9, H8
BtuB	594	Vitamin B ₁₂ -Rezeptor	BF23
CirA	638	?	
FecA	741	Eisendicitrat-Rezeptor	
FepA	724	Enterobactin-Rezeptor	
FhuA	714	Ferrichrom-Rezeptor	T1, T5, ϕ 80, UC-1
FhuE	693	Coproden-Rezeptor	
IutA	707	Aerobactin-Rezeptor	
TolC	471	Typ I-Proteinsekretion, Export niedermolekularer Substanzen	

Phagenresistenz: Omp wird deletiert oder so mutiert, dass der Phage nicht mehr binden kann.

Genotypen und Phänotypen der *E. coli*-Stämme:

Phage:	Lambda	K3	Tu1b	Tu1a
Rezeptorprotein:	LamB	OmpA	OmpC	OmpF
Bakterienstamm				
K12 (Wildtyp)				
B (Wildtyp)			OmpC ⁻	
OMP1	$\Delta lamB$		OmpC ⁻	
OMP2			OmpC ⁻	<i>ompF::Tn5</i>
OMP3	$\Delta lamB$		OmpC ⁻	<i>ompF::Tn5</i>
OMP4	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	OmpC ⁻	<i>ompF::Tn5</i>
OMP6	$\Delta lamB$		$\Delta ompC$	
OMP7	$\Delta lamB$		$\Delta ompC$	<i>ompF::Tn5</i>
OMP8	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	$\Delta ompC$	<i>ompF::Tn5</i>
OMP12	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	$\Delta ompC$	
UH300		$\Delta ompA$		
UH310	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$		

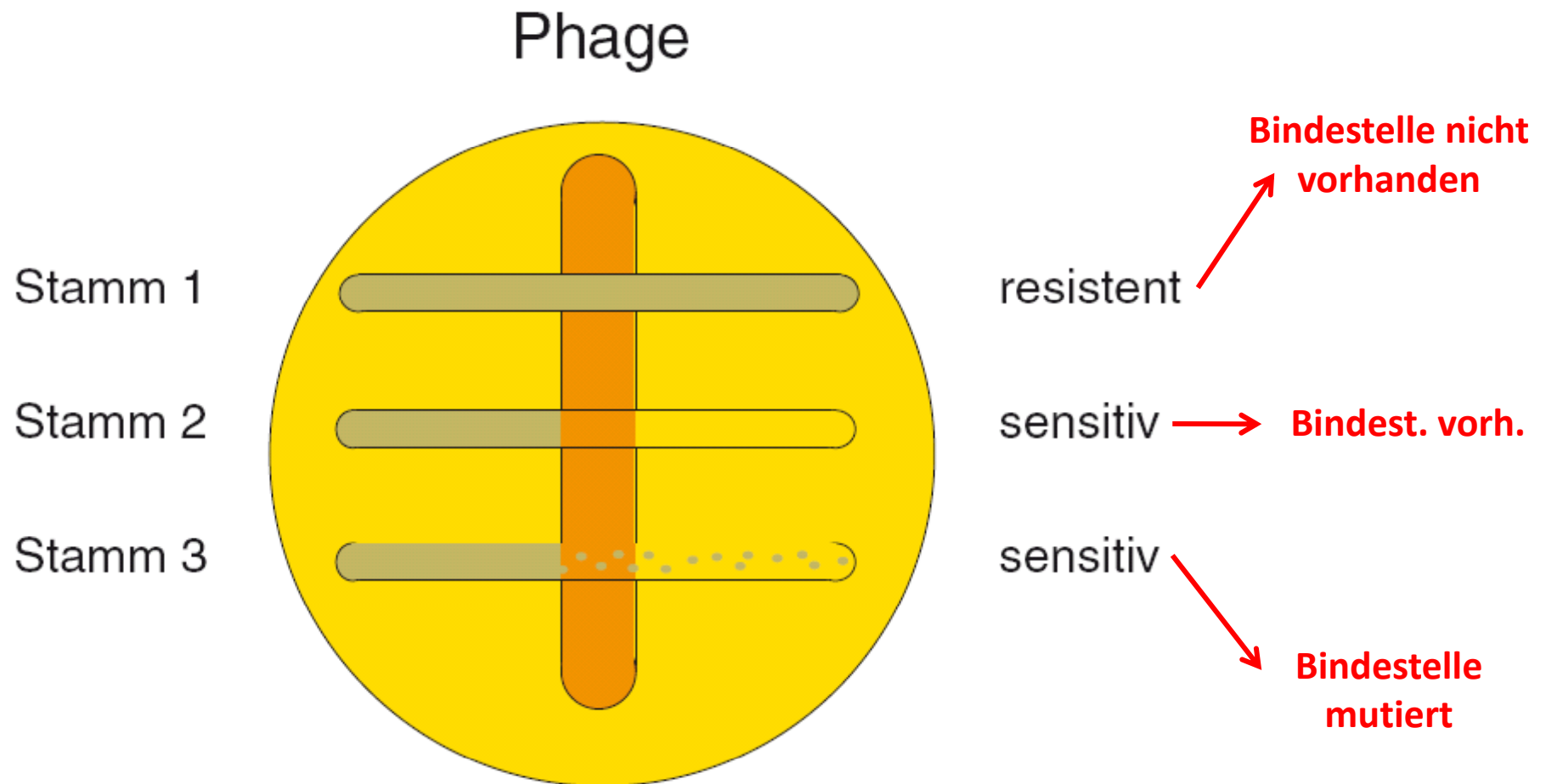
Δ = Deletion des Gens \rightarrow z.B. $\Delta lamB$

⁻ = Gen ok, aber Regulator nicht funktionell \rightarrow kein Protein \rightarrow z.B. OmpC⁻

Tn = Transposoninsertion

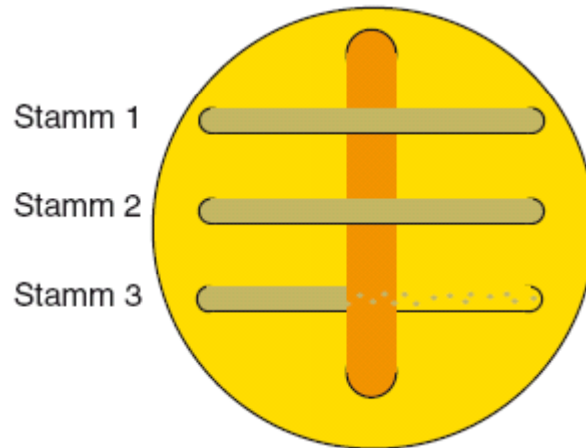
Versuch III: Querstrichtest

Diverse Bakterienstämme (*E. coli*) weisen variable Resistenzen gegenüber verschiedenen Phagen auf:

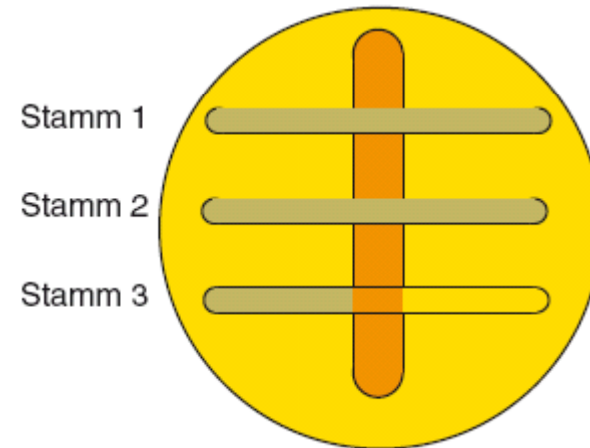


Versuch III: Querstrichtest

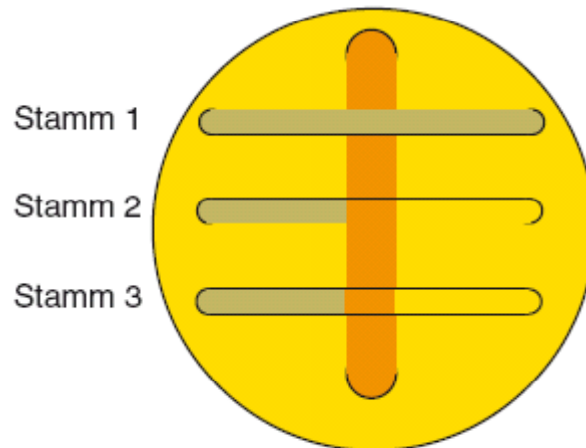
Phage λ



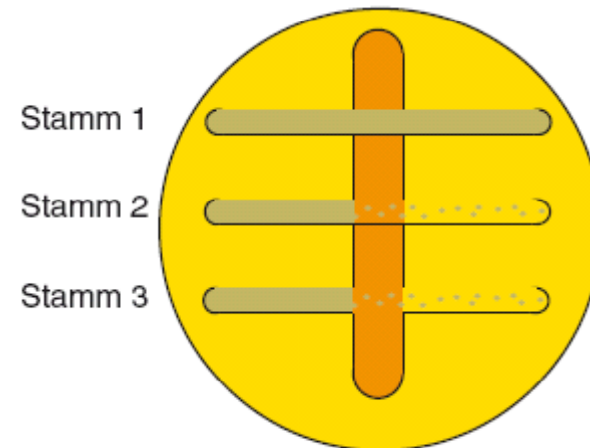
Phage K3



Phage Tulb



Phage Tula



Viren und Wirte

